

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen

Direktor: Prof. Dr. med. F. Heim

**Über die fermentative Hydrolyse
des P-Oxybenzoesäureaethylesters
durch Lebern von Hungertieren**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von

Kâzim Pesen

aus Istanbul

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Erlangen
Direktor: Prof. Dr. med. F. Heim

Über die fermentative Hydrolyse des P-Oxybenzoesäureaethylesters durch Lebern von Hungertieren

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Friedrich-Alexander-Universität

zu

Erlangen

Vorgelegt von

Kâzim Pesen

aus Istanbul



Dekan: Professor Dr. F. Heim.

Referent: Professor Dr. F. Heim

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Februar 1959.

EINLEITUNG.

Die Ester der p-Oxybenzoesäure, wie der Methyl-, Aethyl-, Propyl- und Butylester werden seit vielen Jahren als Konservierungsmittel benützt. In Deutschland ist der p-Oxybenzoesäureaethylester unter der Bezeichnung „Nipagin M“, der p-Oxybenzoesäurepropylester unter dem Namen „Nipasol M“ im Handel. Die Ester der p-Oxybenzoesäure haben sich wegen ihrer hemmenden Wirkung auf Bakterien, Schimmelpilze und Hefen als konservierende Zusätze zu Lebensmitteln, z. B. Fischkonserven, Gemüse und Fruchtsäften und Medikamenten gut bewährt. Durch die Untersuchungen von Jones, Thigpen, Morrison und Richardson sowie von Heim, Leuschner und Wunderlich ist bekannt, daß die Ester der p-Oxybenzoesäure, besonders in der Leber, der fermentativen Hydrolyse anheimfallen, wobei mit weiteren chemischen Umsetzungen der dabei entstandenen p-Oxybenzoesäure zu rechnen ist. Heim, Leuschner und Wunderlich fanden beim Menschen nach peroraler Aufnahme von 10 bzw. 20 mg p-Oxybenzoesäureaethylester/kg Körpergewicht innerhalb der nächsten $4\frac{1}{2}$ Stunden im Blut zwar p-Oxybenzoesäure, nicht dagegen freien Ester. Bei Hunden, denen 25, 100 und 500 mg p-Oxybenzoesäureaethylester/kg Körpergewicht peroral verabreicht wurden, enthielt das Blut nur nach der letztgenannten Dosis von 500 mg/kg Körpergewicht einige Gamma Ester. Dagegen fanden sich im Plasma den verabreichten Estermengen entsprechend hohe Werte an p-Oxybenzoesäure.

Die Frage, ob durch perorale Aufnahme der p-Oxybenzoesäureester diese in nennenswerten Konzentrationen im Blut und im Gewebe auftreten können, ist deshalb von Bedeutung, weil gerade in den letzten Jahren in der deutschen Bevölkerung eine gewisse Angst vor Konservierungsmitteln gezüchtet wurde, wobei man sich vielfach auf das Buch von Eicholtz „Die toxische Gesamtsituation auf dem Gebiet der Ernährung“ berief. In dieser Veröffentlichung werden auch die Ester der p-Oxybenzoesäure als „Stoffe von hoher pharmakologischer Wirkungsintensität, die bei Menschen sehr ausgeprägte pharmakologische Wirkungen, unübersehbar in der Mannigfaltigkeit der Symptome erwarten lassen“, bezeichnet. Eine derartige Charakterisierung wäre aber nur dann berechtigt, wenn die Ester nach peroraler Aufnahme in beachtlichen Konzentrationen im Blut nachzuweisen wären. Dies ist jedoch auf Grund der oben angeführten Versuche nicht der Fall. In diesem Zusammenhang ist von Bedeutung, daß ein Erwachsener in konservierten Lebensmitteln auf einmal kaum jemals mehr als 10 mg/kg Körpergewicht Ester zu sich nehmen kann.

Durch eine große Zahl von Veröffentlichungen der letzten Jahre wissen wir, daß im Hungerzustand der Gehalt der Leber an Fermenten sich erheblich gegenüber der Norm verändern kann (K. Lang). Aus der Tabelle 1 ist das Verhalten von Enzymen beim Hungern oder bei eiweißarmer Ernährung zu ersehen. Mit wenigen Ausnahmen nehmen in Leber, Niere und Muskulatur die Fermente im Hungerzustand ab.

Tabelle 1

Enzym	Organ	Tier	Effekt
Xanthinoxydase	Leber	Ratte	—
D-Aminosäureoxydase	Niere	"	—
Succinoxydase	Leber	"	—
Katalase	"	"	—
Alkalische Phosphatase	"	"	—
Kathepsin	"	"	—+
Arginase	"	"	—
Cytochromoxydase	"	"	0+
Rhodanese	"	"	—
Pseudocholinesterase	"	"	0
Pseudocholinesterase	Ges. Organismus	"	—
Phosphorylase	Muskel	"	—
ATP-ase	Leber	"	0—
Dipeptidase	"	"	0
Esterase	"	"	—
Cholinoxydase	"	"	—
ATP-ase	Muskel	"	0
Saure Phosphatase	Leber	"	0
Transaminase	"	"	—
DPN-Cytochromreduktase	"	"	—

— = Abnahme; 0 = unverändert.

Es erhebt sich nun die Frage, ob im Hungerzustand auch die für die fermentative Hydrolyse der p-Oxybenzoesäureester verantwortlichen Esterasen, vor allem in der Leber, in der sehr wahrscheinlich der weitaus größte Teil der Ester hydrolysiert wird, eine nennenswerte Abnahme erfahren. Bei einer wesentlichen Verminderung der Esteraseaktivität im Hungerzustand könnte der Abbau der mit konservierten Nahrungsmitteln aufgenommenen und vom Darm resorbierten Ester so verzögert sein, daß sie vielleicht in pharmakologisch wirksamen Konzentrationen im Körper auftreten würden.

Es wurde deshalb in dieser Arbeit die Esteraseaktivität der Lebern normal ernährter Tiere bestimmt und mit der Geschwindigkeit der Nipaginhydrolyse durch Lebern hungernder Mäuse verglichen. Mäuse haben bekanntlich einen sehr hohen Stoffwechsel und gehen, wenn man sie vollkommen hungern läßt, bereits nach wenigen Tagen an Marasmus zu Grunde. Die Untersuchungen wurden deshalb an Tieren durchgeführt, die längstens drei Tage gehungert hatten, da bereits vom vierten Hungertag ab die meisten Tiere spontan zu Grunde gingen.

Wenn man weißen Mäusen etwa 2 Mikrogramm/Gramm Körpergewicht Reserpin verabreicht, dann geraten sie in einen stuporösen Zustand, in dem sie mehrere Tage kaum Nahrung aufnehmen und deshalb stark an Gewicht verlieren. Doch überleben sie Tiere, denen das Futter total entzogen wurde wahrscheinlich weil durch Bewegungslosigkeit und Senkung der Körpertemperatur der Energiebedarf stark vermindert ist. Auch an derartig mit Reserpin vorbehandelten Tieren wurde 1, 3 und 5 Tage nach Verabreichung des Reserpins die Esteraseaktivität der Lebern gegenüber p-Oxybenzoesäureäthylester bestimmt.

METHODIK

Den Versuchstieren wurden nach Tötung die Leber sofort herausgenommen. Diese wurden homogenisiert und im Verhältnis 1 : 10 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Zu 0,5 ml Leberhomogenisat wurden 100 γ p-Aminobenzoesäureäthylester in 1,5 ml Wasser zugesetzt. 0, 5, 10, 20 und 30 Minuten nach der Inkubierung des Leberhomogenats mit dem Ester erfolgte durch Hitzedenaturierung (Eintauchen in kochendes Wasser) die Unterbrechung der Fermentreaktion. Die Bestimmung des p-Oxybenzoesäureäthylesters geschah in folgender Weise. Die Proben wurden nach Auffüllen auf 3 ml durch Zusatz von 0,25 ml 5%iger Natriumbicarbonatlösung alkalisch gemacht. Anschließend wurden sie zweimal mit 18 ml peroxyfreiem Äther ausgeschüttelt. Nach Abdampfen der insgesamt 36 ml Äther im Wasserbad von 40° wurde der Rückstand unter Erwärmen und Schütteln in 2 ml Wasser aufgenommen und nach Zugabe von 0,2 ml konzentrierter Natronlauge anschließend im siedenden Wasserbad 30 Minuten lang hydrolysiert. Anschließend wurde mit Schwefelsäure angesäuert und erneut mit Äther ausgeschüttelt. Der Rückstand wurde unter Erwärmen in 2 ml Wasser aufgenommen, nach Zusatz von 0,2 ml 4%igem Borax, 0,2 ml Diazo-Reagenz und 2 ml Azeton 20 Minuten bis zur Messung der Extinktion der orangeroten Farbe bei Zimmertemperatur stehen gelassen.

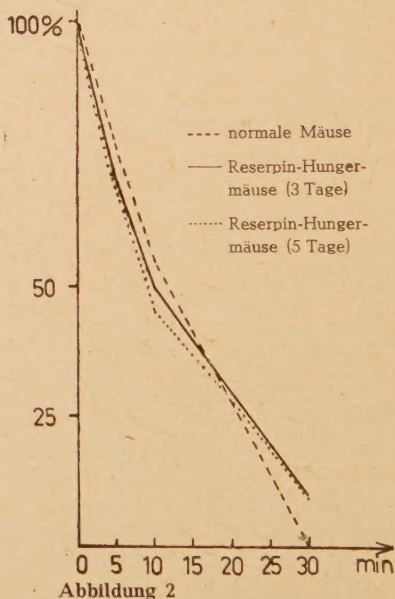
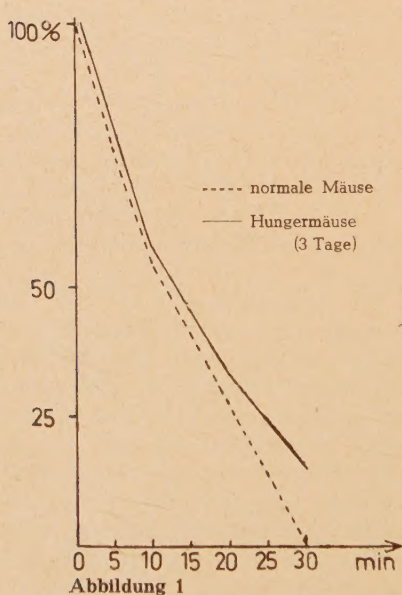
Zur Erstellung einer Eichkurve wurde in genau der gleichen Weise verfahren, nur daß anstelle des nipaginhaltigen Leberhomogenats wäßrige Nipaginlösungen verwendet wurden, die 0, 10, 20, 30, 40, 50 und 100 γ Nipagin enthielten. Eine auf diesem Wege gewonnene Eichkurve ist geradlinig.

VERSUCHSERGEBNISSE

Die fermentative Hydrolyse von 100 γ Nipagin durch 0,5 ml Leberhomogenat = 0,05 g Frischleber ergibt sich aus Abbildung 1.

Die Kurve stellt die Mittelwerte aus 10 Versuchen dar. Der Abbildung entnehmen wir, daß innerhalb 30 Minuten das zugesetzte Nipagin vollständig aus dem Ansatz verschwindet, weil es hydrolysiert wird. Aus der gleichen Abbildung geht weiterhin hervor, daß der fermentative Abbau von Nipagin durch Leberhomogenate von weißen Mäusen, die drei Tage gehungert hatten, sich von dem der normal genährten Tiere in den ersten 25 Minuten nicht unterscheidet. In den letzten 10 Minuten verläuft der Abbau etwas langsamer, so daß innerhalb 30 Minuten 88% des zugesetzten Nipagins hydrolysiert werden. Die Gewichtsverluste der Tiere betrugen nach drei Hungertagen im Mittel 14% des Ausgangskörpergewichts.

Die spontane Verweigerung der Nahrungsaufnahme der mit Reserpin behandelten weißen Mäuse ergibt sich aus der Tat-



sache, daß das Gewicht dieser Tiere nach drei Tagen im Mittel um 17% und 5 Tage nach Reserpin im Mittel um 25% gegenüber dem Ausgangsgewicht abgenommen hat. Trotz dieser starken Gewichtsverluste wird durch die Leber dieser Tiere Nipagin mit nahezu der gleichen Geschwindigkeit hydrolysiert, wie dies durch Leberhomogenate normal ernährter Tiere geschieht. Innerhalb 30 Minuten werden durch die Lebern von Tieren, die 3 Tage unter Reserpin gehungert hatten 92%, durch Lebern der Tiere, die 5 Tage gehungert hatten, 93% des zugesetzten Nipagins hydrolysiert. (Abbildung 2.)

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Aus den mitgeteilten Versuchen ergibt sich, daß Tiere, die drei bzw. fünf Tage gehungert haben, Gewichtsabnahmen von 14–17% bzw. 25% aufweisen. Insbesondere zeigen diese Versuche, daß weiße Mäuse unter der Einwirkung von Reserpin spontan die Futteraufnahme verweigern und dabei Verluste ihres Körpergewichts erleiden, die denen zwangsläufig hungernder Tiere entsprechen. Die Versuche haben weiterhin ergeben, daß ein Homogenisat aus 0,05 Gramm Mäuseleber im Stande ist, innerhalb 30 Minuten 100 γ p-Oxybenzoesäureaethylester vollständig zu hydrolysieren. Fast die gleiche Aktivität weisen die Lebern von Hungertieren auf, wenn auch der Abbau des Nipagins in den letzten 10 Minuten gegenüber den Kontrollversuchen etwas verlangsamt ist.

Aus den Versuchen darf geschlossen werden, daß auch bei hungernden Menschen die Aufnahme von Nahrungsmitteln, die p-Oxybenzoesäureester als Konservierungsmittel enthalten, nicht zu einer Erhöhung der Esterkonzentration im Blut und im Gewebe führen dürfte, weil der Hungerzustand scheinbar nicht den Gehalt der Leber an p-Oxybenzoesäureester spaltenden Enzymen nennenswert herabsetzt.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Hydrolyseaktivität der Leber weißer Mäuse für p-Oxybenzoesäureaethylester bestimmt. 0,05 g Leber (Frischgewicht) hydrolysieren in 30 Minuten 100 γ p-Oxybenzoesäureaethylester. Weiße Mäuse, denen die Nahrung entzogen wurde und weiße Mäuse, die durch Reserpinvorbehandlung die spontane Nahrungsaufnahme verweigern, verlieren innerhalb 3 Tagen 14–17%, innerhalb 5 Tagen 25% ihres Körpergewichts. Trotzdem zeigen die Lebern dieser Tiere eine nur um 7–12% verminderte Hydrolyseaktivität gegenüber p-Aminobenzoesäureaethylester.

LITERATURVERZEICHNIS

- P. S. Jones, D. Thigpen, J. Morrison and A. P. Richardson:
J. Amer. Pharmaceut. Assoc., Sci. Ed. 45, 268 (1956).
- F. Heim, F. Leuschner und G. Wunderlich: Klin. Wschr. 1957,
S. 823.
- F. Eicholtz: Die toxische Gesamtsituation auf dem Gebiet der menschlichen Ernährung. Berlin-Heidelberg-Göttingen 1956.
- K. Land, in: Biologie und Wirkung der Fermente. Berlin-Heidelberg-Göttingen 1953.

Lebenslauf

Ich, Kâzim Pesen, wurde am 30. 8. 1929 als Sohn des Autoelektrikers Yakup Pesen und seiner Ehefrau Gülizar Pesen in Trapezunt (Türkei) geboren. Ab 7. Lebensjahr besuchte ich 5 Jahre lang die Volksschule, 3 Jahre lang die Mittelschule und 3 Jahre lang das Gymnasium in Istanbul. Im Jahre 1949 legte ich meine Abschlußprüfung ab. Aus gesundheitlichen Gründen konnte ich mein Studium nicht sofort antreten. Im Jahre 1951 begann ich an der Universität Heidelberg Medizin zu studieren. Nach 5 Semestern wechselte ich mein Studienfach und studierte ab dem Sommersemester 1955 an der Universität Erlangen Zahnmedizin. Nach 2 vorklinischen Semestern (2 Semester wurden mir von meinem medizinischen Studium angerechnet) legte ich im Wintersemester 1955/56 das zahnmedizinische Physikum ab. Mein Studium habe ich an der Erlanger Universität fortgesetzt und habe am 18. Februar 1959 das zahnärztliche Staatsexamen bestanden.

Erlangen, den 24. 2. 1959.

Kâzim Pesen.

